

[First Hit](#)[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)[Generate Collection](#)[Print](#)

L19: Entry 7 of 17

File: JPAB

Mar 2, 1992

PUB-NO: JP404066536A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 04066536 A

TITLE: ANTIVIRAL SUBSTANCE AND PRODUCTION THEREOF

PUBN-DATE: March 2, 1992

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

IIZUKA, CHIYOKICHI

OHASHI, YASUHIRO

SUZUKI, FUMIKO

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

NODA SHIYOKUKIN KOGYO KK

APPL-NO: JP02176559

APPL-DATE: July 4, 1990

INT-CL (IPC): A61K 35/84; C12P 19/04; C12P 21/00

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain an antiviral agent, consisting essentially of a sugar- and protein-containing water-soluble modified lignin extracted from a mycelial culture of a basidiomycete cultured by using a specific culture medium and excellent in safety without any fear of side effects.

CONSTITUTION: An antiviral agent is obtained by culturing a basidiomycete, preferably Lentinus edodes Sing. using a culture medium consisting essentially of a raw material prepared from a plant (preferably a gramineous plant) containing lignin, preferably a culture medium consisting essentially of bagasse, as necessary, adding and mixing rice bran, sawdust, peptone, yeast, etc., therewith, autolyzing mycelia utilizing enzymes existing in the mycelia after completing the culturing, then extracting active ingredients with warm water or hot water at  $\geq 40^{\circ}$  C, fractionating the resultant extract solution according to, e.g. an ultrafiltering method and providing a fraction rich in water-soluble lignin. Thereby, powerful activity against viruses of the genus animal Herpes is obtained in a fraction having  $\geq 200,000$  molecular weight.

COPYRIGHT: (C)1992, JPO&amp;Japio

[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平4-66536

⑫ Int. Cl. 5 識別記号 延内整理番号 ⑬ 公開 平成4年(1992)3月2日

A 61 K 35/84	ADY A	7180-4C
C 12 P 19/04	B	8214-4B
21/00	A	8214-4B
//(C 12 P 19/04		
C 12 R 1:645)		
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:645)		

8319-4B

審査請求 有 請求項の数 6 (全5頁)

## ⑭ 発明の名称 抗ウイルス物質とその製造方法

⑮ 特願 平2-176559

⑯ 出願 平2(1990)7月4日

⑰ 発明者 飯塚 千代吉 千葉県野田市清水905-10  
 ⑰ 発明者 大橋 康宏 千葉県野田市岩名1-51-11  
 ⑰ 発明者 鈴木 史子 埼玉県北葛飾郡庄和町米島436-5  
 ⑰ 出願人 野田食菌工業株式会社 千葉県野田市清水121番地  
 ⑰ 代理人 弁理士 和田 成則

## 明細書

## 1. 発明の名称

抗ウイルス物質とその製造方法

## 2. 特許請求の範囲

1. リゲニンを含有する植物から調整された原料を主成分とする培地を用いて担子菌を培養し、この菌糸体培養物から抽出された糖・蛋白含有水溶性変性リゲニンを主成分とする抗ウイルス物質。

2. 担子菌の菌糸体として用い得られた請求項1記載の抗ウイルス物質。

3. 菌糸体を自己消化させた菌糸体培養物の熱水抽出物またはその精製画分を含有する請求項1または請求項2記載の抗ウイルス物質。

4. リゲニンを含有する植物から調整された原料を主成分とする培地を用いて担子菌を培養し、この菌糸体培養物から糖・蛋白含有水溶性変性リゲニンに富む成分を抽出することを特徴とする抗ウイルス物質の製造方法。

5. 担子菌の菌糸体を用いる請求項4記載の抗ウイルス物質の製造方法。

6. 菌糸体を自己消化させた菌糸体培養物の熱水抽出物またはその精製画分を含有する請求項4または請求項5記載の抗ウイルス物質の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〈産業上の利用分野〉

本発明は担子菌の菌糸体培養物から得られる抗ウイルス物質およびその製造方法に関する。

## 〈従来の技術〉

近年、医療分野および農業分野においてウィルス感染病が重大な問題となっている。

例えばB型肝炎およびC型肝炎は、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスによって感染者に肝障害を起こし、急性または慢性肝炎から肝硬変、さらには肝癌へ進行させ患者を死に至らせる。

またヒトエイズウィルスは、ヒトのT<sub>4</sub>陽性T細胞に親和性をもち、これを感染死滅させるため患者は免疫不全を来たし、後天性免疫不全症候群を引き起こし、発症後はほぼ100%の患者が数年から10年以内で死に至っている。

さらに、ヒトヘルペスウィルス(1型、2型)

は、広範な疾患例えは口内炎、陰部ヘルペス、角膜炎、結膜炎、上下気道感染などを引き起す。

一方、農業面においてはタバコ、トマト、ピーマン、キュウリ、などはタバコモザイク病、キュウリモザイク病、キュウリ緑斑モザイク病などに罹病し、著しい被害を受けることが多く、また、蘭などの花卉類においてもウィルスによるモザイク病に罹病し、商品価値に大きな影響を与える場合が多い。

現在、このようなウィルス病に対する適切な治療剤は極めて少なく、例えはインターフェロン、デュンアラビノシッド、アジドチミジン、アシクロビルなどの治療剤が知られているが、副作用が強いなどの問題があった。また、植物に関しては治療効果のある毒性の低い大根散布可能な物質はない。

従って、このようなウィルス病の防疫においては未然にウィルスの感染を防止する点が重要であるが、ウィルスの感染を予知することは困難であるので、安全で効果的な、しかもスペクトルの広

量が少ないので、その効果を高めることができなかった。

本発明の目的は、椎茸等の担子菌の菌糸体培養物から抗ウィルス作用を示す有効成分を効率的に取り出し、より効果の高い抗ウィルス物質およびその製造方法を提供することにある。

#### （課題を解決するための手段）

本発明者らは、上記目的を達成するために、椎茸等の菌糸体培養物から熱水抽出、限外濾過などの手段によって、抗ウィルス作用を示す有効成分を簡単にかつ効率的に分離し、この物質を詳細に分析した結果、水溶性リグニンを主成分とし、糖質、蛋白質が結合した物質であることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の抗ウィルス物質は、リグニンを含有する植物から調整された原料を主成分とする培地を用いて担子菌を培養し、この菌糸体培養物から抽出された水溶性リグニンを有効主成分とするものである。

また、本発明による抗ウィルス物質の製造方法

いウィルス感染防止剤が望まれる。

ところで、本発明者らは長年に亘って椎茸等の担子菌類の菌糸体培養物から抽出した物質について研究を続けてきた。そして上記培養物から抽出された物質が免疫賦活作用を有すること（特公昭53-23392号）、上記培養物から抽出された分子量600万～150万（A画分）および150万～80万（B画分）の物質がB型慢性肝炎に有効であること（特開昭62-70532号）、上記培養物から抽出された多糖およびゼアチン関連物質を主体とするサイトカイニン系活性物質の複合体が抗ウィルス剤として有効であること（特公昭62-36009号）などを既に見い出している。

#### （発明が解決しようとする課題）

椎茸等の担子菌の菌糸体培養物から抽出された物質は、優れた抗ウィルス活性を示し、かつ毒性がほとんどないので副作用の心配はない。

しかし、上記菌糸体培養物から抽出された物質の有効成分を取り出す方法は複雑であり、かつ収

量が少ないので、その効果を高めることができなかった。

は、リグニンを含有する植物から調整された原料を主成分とする培地を用いて担子菌を培養し、この菌糸体培養物から水溶性リグニンに富む成分を抽出することを特徴とする。

以下、本発明についてその好ましい態様を挙げながらさらに詳細に説明する。

本発明で使用する担子菌としては、例えは椎茸、カワラ茸、ヒラ茸、エノキ茸、マンネン茸、マイ茸等食用茸、薬用茸など各種のものが挙げられるが、この中でも特に椎茸菌が好ましい。

本発明では、これらの担子菌の菌糸体を培養してその培養物から有効成分を抽出する。この場合、培地としては固体培地、液体培地のいずれも使用できるが、培地成分中にリグニンを含有する植物から調整された原料を含有させることが必要である。リグニンを含有する植物としては、特に禾本科植物が好ましく用いられ、このような原料としては、例えはバガス、麦わら、稲わら、とうもろこしの茎葉、米糠、小麦ふすまなどが挙げられる。特にバガスを主成分とし、必要に応じ他の栄養成

分として、米糠、鋸屑、ペブトン、イースト、甘蔗廃糖蜜などを添加混合した培地が好ましく用いられる。

担子菌の菌糸体の培養は、例えば担子菌の胞子を液体培養して得られる菌糸体ペレットを上記のような培地に接種して行なう。菌糸体を接種した後、固体培地の場合は、例えば温度18~25℃、湿度50~90%程度に空調された培養室で3か月~6か月程度培養する。最も理想的には、温度20~25℃、湿度60%に空調した培養室で4~6か月程度培養する。こうして菌糸体が蔓延した培地は、温度処理室に移して変温処理を行なうことが好ましい。変温処理は、例えば32~34℃で24~48時間加温し、次に低温処理室に移して4~8℃、湿度85%にて5~7日間低温処理を行なう。この変温処理は、製品の品質の安定上好ましく採用されるが、必ずしも必要なものではない。その後、培地を栽培室に移して放置すると、子実体の発生が始まるが、この時点で培養を終了し、後述するように培養物を粉碎機により粉

碎する。一方、液体培地の場合は、通気培養もしくは振とう培養により、15~30℃の温度条件下1週間~1か月程度培養を行なう。培養は、培地中に菌糸体が蔓延した状態で終了する。

培養終了後、菌糸体に内在する酵素を利用して菌糸体を自己消化させるとともに、培養物を抽出する。その好ましい方法として、固体培地の場合は、まず、培養が終了した培養物を粉碎し、粉碎物を40~90℃で3~6時間程度処理して菌糸体の酵素によって自己消化させる。次に、この粉碎物に40℃以上の温水または热水を注いで有効成分を抽出する。こうして得られた懸濁液を例えれば、セルロースの濾過袋に充填し、これを加圧、濾過し、この濾液をさらにメンブランフィルタで濾過して除菌し、有効成分が含有された抽出液を得る。一方、液体培地の場合は、必要に応じて菌糸体を粉碎した後、40℃~60℃に加熱して自己消化を行なわせ、菌糸体が溶解した液状の懸濁培養物を得る。この培養物を上記と同様に濾過、除菌して抽出液を得ることができる。

本発明の抗ウィルス物質の製造に際しては、こうして得られた抽出液をさらに水溶性リグニンに富む成分を精製することが望ましい。この精製方法としては、例えば限外濾過法を採用して分画した。抽出液を分子量10,000および200,000の濾過膜で限外濾過を行なった場合、200,000以上の画分に動物ヘルペス属ウィルスに対する強い活性が得られた。本画分の収率は、抽出液から平均10%が得られた。

こうして得られた抗ウィルス物質はリグニン含有多糖蛋白複合体であることが判明した。

この製造方法によれば、抽出液の有効成分中には比較的高濃度の無機物が含まれているが、これらの物質は分子量10,000以下の画分にほとんど移行するので、簡単に画分することができた。

これらの結果から、抗ウィルスを示す有効成分は次のような組成を有するものであることが確認された。

試 料	糖	蛋白	リグニン	灰分	合 計
原 体	40.8	11.7	35.7	14.5	102.7
20万 以上	66.2	6.4	47.7	3.0	123.3
1万~ 20万	71.0	7.8	42.2	4.6	125.6
1万 以下	35.0	11.1	24.7	15.3	86.1

糖 : フェノール硫酸法 (glucose standard, 480nm)

蛋白 : セミミクロケルダール法

リグニン : アセチルプロマイド法 (吸光係数20で算出)

灰 分 : 直接灰化法

K, Na, Ca : 原子吸光法

(作用)

本発明において、椎茸菌糸体の培養抽出物あるいはその分画を含む物質が後述する実施例から明らかなように、各種ウィルスに対して標的細胞と

の結合を阻害し、その結果ウィルスの感染を阻止しているものと考えられる。

本発明の抗ウィルス物質の製造方法によれば、抗ウィルス作用を有する有効成分を効果的に抽出、分離することができ、かつ、天然物から得られたものであるため合成化学品などにおける副作用の心配はない。

#### 《実施例》

##### 実施例1

###### (1) 椎茸菌糸体の培養

バガス90%、米糠5%、ふすま等の栄養源5%を配合した固体培地を常法により殺菌し、これに椎茸の種菌を接種する。その後、培地を温度20~25℃、湿度60%に空調した培養室内に移して3~6か月培養する。培地中に菌糸体が蔓延した後、温度処理室に移して32~34℃で24~48時間加温し、次に低温処理室に移して5~8℃、湿度85%にて5~7日間低温処理を行う。その後、培地を栽培室に移して放置し、培地表面から子実体が発生し始めたら、培地を取り出

して粉碎機で破碎する。

###### (2) 培養物からの有効成分の抽出

上記破碎物を80℃前後で3~4時間通気加熱し酵素反応を促進させ、菌糸体の自己消化を行なうとともに、水分3~5%まで乾燥する。この破碎物600gに対して約5lの水を加え、約1時間煮沸するとともに攪拌する。この攪拌によって菌糸体の代謝産物および菌糸体細胞液中に含有されている有効成分が水に溶脱される。こうして得られた懸濁液をセルロースフィルタで濾過して除菌し抽出液を得る。この抽出液を濃縮し、凍結乾燥等にて褐色の粉末とした。

上記粉末の成分を分析した結果、糖：34.0%，蛋白質：10.8%，水溶性リグニン：43.0%，その他：12.2%であった。なお、糖はフェノール／硫酸法で定量し、蛋白質はセミクロケルダールで定量し、リグニンはアセチルプロマイド法で定量した。

###### (3) 有効成分の分画

抽出液をそのまま、または濃縮し、分子量200,000の限外濾過膜で限外濾過を行ない、分画分子量200,000以上の画分を得た（以下Fr. 1とする）。

次に、上記限外濾過により通過した液をさらに分子量10,000の限外濾過膜で限外濾過を行ない、分子量200,000通過、10,000不通過画分（1万~20万以下Fr. 2とする）、および10,000通過画分（1万以下、以下Fr. 3とする）を得た。Fr. 1~Fr. 3を濃縮し、凍結乾燥して褐色の粉末を得た。これらの成分分析については前述に示した通りである。

##### 実施例2

抽出液および分画品の、ウィルス吸着に対する阻害の強さを測定した。

牛腎由来MDBK細胞を24穴組織培養用プレートに生育させた。IBR (Infection s Bovine Rhinotracheitis) ウィルス (DNA型、ヘルペスウィルス

群) を0.2ml中に50ないし100ブラーク形成単位含むように、2%の血清を含むイーグルMEMからなる培地で希釈した。抽出液あるいはその分画を段階希釈したもの、および比較したい薬剤を段階希釈したものをウィルス希釈液と等量混合し4℃で1時間反応させた。グルベッコー処方のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で、プレート中の細胞を洗った後、反応液0.2mlずつを各穴に加え、37℃で1時間細胞と接触させた。細胞をPBSで洗った後、0.2%の寒天を含む前述した培地を重層し固定した上で、3日間炭酸ガス孵卵器中で培養した。ブラークの計数は、各穴の細胞を1mlずつの10%ホルマリンで固定し、0.5mlずつの0.03%メチレンブラーで染色して行なった。抽出液および分画の段階希釈した各濃度におけるブラーク阻止率を計算し、試料のED<sub>50</sub> (μg/ml) を算出した結果を示す。

## 手続補正書

平成2年8月24日

通

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

特願平2-176559号

## 2. 発明の名称

抗ウィルス物質とその製造方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 千葉県野田市清水121番地

名称 野田食菌工業株式会社

代表者 飯塚 千代吉

## 4. 代理人 №101

住所 東京都千代田区内神田1丁目15番16号

東光ビル6階 電話03(295)1480,1909

氏名 (6943) 弁理士 和田成則 通

## 5. 補正命令の日付 (自発)

## 6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

2.8.27  
出願課  
手続

抽出液 Fr. 1 Fr. 2 Fr. 3	(原体) (> 20万) (1万~20万) (< 1万)	ED <sub>50</sub> (μs/ml) 55.1 13.0 110.0 無効

これらの結果から、IBRVの感染阻止が最も強い部分は限外濾過膜で20万以上に分画される部分であることが判明した。

## 《発明の効果》

本物質は優れた抗ウィルス活性を示し、かつ毒性がないので副作用の心配がなく、安全性に優れる。

また、本製造方法によれば、ウィルスを感染阻止する物質を簡単に効率よく分画、回収することができ、動物および植物ウィルスの感染阻止剤として広く応用することができる。

特許出願人 野田食菌工業株式会社  
代理人 弁理士 和田成則

## 7. 補正の内容

- (1) 明細書第2頁第12行目に「CC型」とあるのを「C型」と補正する。
- (2) 明細書第13頁第18行目に「infection」とあるのを「infectious」と補正する。
- (3) 明細書第14頁第17行目に「μs」とあるのを「μg」と補正する。